

Válasz opponenseim doktori értekezésemről készült bírálatára

Először is nagyon szeretném megköszönni opponenseimnek, hogy elvállalták doktori értekezésem bírálatát és köszönöm elismerő szavaikat szakmai teljesítményemről. Igen resteltem, hogy az elkészült értekezés minősége elmaradt az elvárttól.

Az értekezést igyekeztem a lehető legkörültekintőbben elkészíteni, ami úgy látszik nem sikerült maradéktalanul. Sajnálom, hogy ilyen sok, jogosan kifogásolt hiba (túlzó, sokszor nem megfelelő mozaikszo használat, helytelenül leírt, rosszul toldalékolt vírusnév, az angol kifejezések nem megfelelően használt magyar megfelelő használata, a tézisek és a dolgozat eltérő címe, az ékezetes betűk nem konzekvens használata, rossz szimbólumokkal írt irodalmi hivatkozás) benne maradt a végső változatban.

Köszönöm, hogy ezen hibák ellenére opponenseim elismerik új tudományos eredményeimet és ezek alapján javasolják számomra az MTA doktori cím odaítélését.

A következőkben szeretnék opponenseim minden véleményére megjegyzésre, kérdésére válaszolni.

Lukács Noémi és Putnoky Péter is megkérdezte, hogy *vajon milyen mechanizmus alapján lehetne magyarázni a különböző típusú VSR fehérjék azonos hatását a miR168 indukcióra? Született-e a kísérletek lezárása óta olyan irodalmi adat, amely a megfigyelésekre magyarázatot ad?*

Ez egy nagyon izgalma és jó kérdés!

A miR168-on keresztül történő AGO1 szabályozás egy alternatív útvonal, mely a VSR-ek elsődleges géncsendesítést gátló funkcióján kívül is képes a gazdanövény válaszreakcióját blokkolni. Rendkívül érdekes nemcsak az, hogy mennyire elterjedt ez a „másodlagos” funkció, de az is, hogy vajon mi ennek a mechanizmusa.

A miR168 indukciója a prekursor transzkripciók aktivitásának eredménye. Az *Arabidopsis thaliana* miR168a prekursorának promóterében négy abszcizinsav válasz elem (abscisic acid-responsive element - ABRE) található. Ezen ABRE motívumoknak, melyek a miR168 promóterében különböző növényfajok esetében is megtalálhatóak, szerepe van az abszcizinsav sav kezelés és abiotikus stresszek során szintén indukálódó miR168 expresszió kifejeződésében (*doi: 10.1104/pp.111.188789*). Ezen szabályozóelemek jelenléte felveti annak lehetőségét, hogy a VSR-ek is ezeken keresztül fejtik ki indukáló hatásukat.

A vizsgált VSR-ek mindegyike indukálta a miR168 expresszióját tranziens kísérletekben, és a vizsgált vírusok szintén elérték ezt a hatást különböző növényi gazdáiban. A vizsgált VSR-ek, mint fehérjék, azonban nagyon különbözőek, nem találtunk bennük semmi közös vonást, olyat, ami a miR168 prekursor transzkripcióját esetleg indukálhatná. Ugyan azt nem tudjuk, hogy a miR168-on keresztül történő AGO1 gátlás hogyan valósul meg, az biztos, hogy ennek kulcsfontosságú jelentősége van a vírusfertőzés során az antivirális géncsendesítés gátlásában. A mi munkáinkon kívül nem találkoztunk olyan kutatással, melyben a VSR-ek miR168 indukciós képességét vizsgálták volna. Ismert azonban, hogy a VSR-ek más, több különböző mechanizmussal képesek az AGO funkcióját gátolni. Az uborkamozzaik vírus Fny törzsének 2b fehérje az AGO PAZ doménjével lép kölcsönhatásba, a BYV P0 fehérjéje a még nem töltött AGO1 degradációját iniciálja. A VSR-ek egy másik nagy csoportja (ide tartozik a TCV CP-(p38) fehérjéje is), pedig a GW motívumaikon keresztül képesek mimikálni a nem

vírusfertőzött sejt endogén, AGO-hoz kötődő fehérjéit, és ennek segítségével kötődnek az AGO-hoz gátolva annak aktivitását.

A kísérleteink óta eltelt időben számos vírus VSR-ét jellemezték. Az irodalmat átböngészve azonban nem találtuk nyomát annak, hogy akár a mechanizmust, akár az újonnan jellemzett VSR-ek miR168 indukáló tulajdonságát vizsgálták volna. Ahhoz, hogy a mechanizmusra bármilyen hipotézist állítsunk fel, amely meglétét kísérletesen vizsgálni lehet, jó lenne minél több, eltérő funkcióval rendelkező VSR miR168 indukáló képességét vizsgálni. Terveink szerint a jövőben vizsgálunk majd fűszárúakat fertőző vírusokban jelenlevő VSR-eket olyan szempontból, hogy vajon mennyire hasonlítanak, vagy különböznek eltérő gazdanövényekben. Ezen VSR-ek miR168 indukáló képességét vizsgálva azt is meg lehet majd állapítani, hogy ez az indukáló képesség függ-e, vagy független a különböző gazdanövényeken található variánsok esetében. Az esetleg található eltérések segíthetnek olyan kísérletek tervezésében, melyek közelebb visznek minket a mechanizmus felderítéséhez.

Az tehát, hogy a miR168 indukció végül is mennyire elterjedt a VSR-ek között és milyen mechanizmuson keresztül történik nagyon érdekes lenne vizsgálni a jövőben.

Egy másik, többször előforduló kérdés, hogy: *„Milyen standardizálásokat ill. bioinformatikai változtatásokat javasolna az sRNS HTS rutin diagnosztikai bevezetésének elősegítésére? A sRNS HTS technika nem túl munkaigényes és költséges ahhoz, hogy elfogadott diagnosztikai rutin eljárás legyen?”*

Egy adott gazdanövényben az adott földrajzi területen jelenlevő vírusok kimutatására az sRNS HTS és a nagy-áteresztőképességű RNS szekvenálás kombinációja ad majd megoldást. Utóbbi esetben a jelenlevő kórokozó (vírus, viroid) RNS genomjának szekvenciáját, illetve DNS vírusok esetében a transzkriptálódott mRNS szekvenciáját állapítjuk meg. E módszerek esetében azonban a probléma sokszor az, hogy a szekvenált RNS-ek csak nagyon kis %-a keletkezik a jelenlevő vírusokról Szerencsére egyre több fűszárú növényi gazda genomja ismert, így a bioinformatikai módszerekkel viszonylag egyszerűen lehet majd szűrni a nem gazda specifikus RNS-ekre, melyek között a vírus RNS-eket is keresni lehet majd. További segítség lehet egy speciális, ún. „ribodepleció” RNS szekvenálási eljárás használata. Ebben az esetben egy növényi riboszómális RNS-ekre speciális ellenanyaggal a szekvenáló könyvtár készítése előtt eltávolítják az igen nagy mennyiségben jelenlevő rRNS-eket, így a „leolvasott” szekvenciák nagyobb része lesz számunkra hasznos információ. Ebben az esetben azonban a könyvtárkészítés válik bonyolultabbá, ami jelentősen megemeli a szekvenálás költségét. A módszerek további, eddig még nem megoldott problémája, hogy egyelőre nem sikerült minden vírusra és gazdanövényre egyaránt megbízhatóan működő bioinformatikai munkafolyamatot „pipeline”-t optimalizálni. Ugyan vannak próbálkozások a pipeline-ok standardizálására, de egyelőre még nem született optimális megoldás. Egy nemzetközi felmérés, melyben mi is részt vettünk során 21 csoport kapott 10 sRNS HTS adatszettet, amiben növényi vírusokat kellett előrejelezni. Az eredmény azt mutatta, hogy a különböző pipeline-ok használata még ugyanazonon minták esetében is nagyon eltérő eredményt eredményezhet (doi: 10.1094/PHYTO-02-18-0067-R).

Mai véleményem szerint az sRNS HTS valóban túl munkaigényes és költséges ahhoz, hogy rutin diagnosztikai vizsgálat legyen.

Rutin diagnosztikai célokra azt gondolom, hogy a jövőben továbbra is inkább az RT-PCR-ek, vagy az izotermális amplifikáción alapuló, akár a terepen is használható LAMP módszer terjed majd el.

A következőkben opponenseim további kérdéseire adok választ. A követhetőség kedvéért pontokba szedtem válaszaimat és az adott pontnál idézem az opponensem által felvetett problémát és ez után adok rá választ.

Válasz Dr. Lukács Noémi doktori értekezéséről készült opponensi véleményére

Nagyon köszönöm Lukács Noémi elismerő véleményét. Külön köszönöm, Burgyán József iskolateremtő munkájának hangsúlyozását. Igen szerencsés vagyok nemcsak azért, mert ebben az iskolában tanulhattam, hanem azért is, mert Burgyán Józseftől folyamatosan kaptam támogatást és lehetőséget az egyre önállóbb kutatói lét és végül az önálló csoport alakítására.

Opponensem kérdéseire az alábbi válaszokat adom.

1/” Mit ért Jelölt akut, perzisztens, ill. látens fertőzésen? Melyek a perzisztens fertőzés jellemzői, mi a perzisztáló vírus sorsa? Értekezésében, úgy tűnik, hogy a perzisztens és látens kifejezéseket szinonimaként használja. Ezt helyesen értelmezem?”

Az akut és perzisztens fertőzés nevezéktana örök, visszatérő kérdés. Én akut fertőzésként a gyorsan, látványos tünetekkel lefolyó, akár a növény pusztulását okozó fertőzést, ezzel szemben perzisztens fertőzésként a hosszan elnyúló, sokszor tüneteket nem okozó fertőzési folyamatot értem. Látens fertőzésen pedig azt értem, amikor a vírus jelen van a növényben, akár jelentős koncentrációban, mégsem indukál látható tüneteket, így valóban előfordul, hogy szinonimaként használom a perzisztens és látens kifejezéseket. A kísérleteink eredményeit értelmezve belátom, hogy ez a kategorizálás nem helyes. A vírusok egy része a gazdanövényt fertőzve abban nagy mennyiségben képes replikálódni és elterjedni. A tünetek súlyossága attól függ, hogy a vírus jelenléte mennyire változtatja meg a gazdanövény génexpressziós folyamatait. Az általam perzisztensként nevezett fertőzés esetében a vírus úgy tud nagymennyiségben felhalmozódni és elterjedni, hogy a gazdanövény génexpressziós rendszerét csak alig, vagy nagyon kis mértékben változtatja meg. Kísérleteink megdöbbentő eredménye volt az, hogy ezen fertőzések során a vírusfertőzés jellemzőjeként gondolt stresszfolyamatok indukciója is elmaradhat, így a növény túléli a fertőzést akár a vírus nagy mennyiségének jelenlétében is. Lágyszárú növényekben így a vírus a növény - nem a fertőzés miatt bekövetkező - pusztulásáig fennmaradhat a növényben. Fásszárú, évelő növényekben az ilyen, tünetet nem okozó vírusok, szintén hosszú ideig, általában a növény pusztulásáig jelen lehetnek. Egy másik, igen izgalmas kérdés, hogy mi történik „multiplex” fertőzések esetében? Vajon az önállóan tüneteket nem okozó vírusok milyen kombinációja, mikor vezethet végül ahhoz, hogy a gazdanövény génexpressziója megváltozzon? Ezeket a kérdéseket egy most folyó OTKA kutatási projektben vizsgáljuk.

2/” Nagyon sok vizsgálat foglalkozik az irodalomban a tünetek kialakulásáért felelős virális komponensek és folyamatok azonosításával, és ennek itthon is szép hagyományai vannak. Ezeket és a modern molekuláris biológia eszköztárát ismerve, milyen megközelítést tartana különösen ígéretesnek?”

A vírusfertőzésekkel együtt járó betegség tünetek kialakulásában fontos virális komponensek azonosításában a rekombináns technikák megjelenése óta, valóban igen fontos és érdekes eredmények született hazánkban is. Az új technikáknak köszönhetően mutáns és reasszortáns vírusokat lehetett előállítani, melyek lehetőséget adtak a kulcs fontosságú virális elemek meghatározására. A rekombináns vírusok és a nagy-áteresztőképességű szekvenálások kombinálása biztosan segítheti a tünetkialakításban fontos elemek azonosítását. Sok esetben azonban további technikai fejlesztések szükségesek, hiszen sok fásszárú növény esetében a fertőzés megvalósítása a szűk keresztmetszet, mely sok esetben csak pl. rovarvektorok

használatával valósítható meg. Napjainkban a virológiai kutatások a nagy átírási képességű szekvenálási technológiák elterjedése miatt, újból a leíró, és nem a problémafeltáró irányba tolódtak el. Azonban biztos vagyok benne, hogy a nem túl távoli jövőben a mechanizmusokat vizsgáló kutatások iránya újból erősödni fog. Nehéz különösen ígéretes megközelítést kiválasztani, valószínűleg sok új módszer kombinációja lesz az, ami végül közelebb visz ezen komplex folyamatok megismeréséhez.

Opponensem kérdésére válaszolva azonban elsősorban a kutatócsoportomban jelenleg folyó kutatásokat szeretném bemutatni, melyekben a már említett együttes vírusfertőzéseket tanulmányozzuk. A hipotézisünk az, hogy mivel a különböző vírusok VSR-jei az antivirális RNSi-t több különböző ponton képesek gátolni, az együttes fertőzés során azért erősödhetnek fel a tünetek, mert a gazdanövény védekező rendszere több ponton gátlódik. A kérdés megválaszolására gélszűrést követő nagy-átírási képességű szekvenálást használva, azt tervezzük vizsgálni, hogy az egyedi fertőzésekhez képest vajon mennyire változik meg a géncsendesítés végrehajtókomplexébe épülő virális sRNS-ek profilja. Ezek a megközelítések ígéretesnek tűnnek, de csak a kapott eredmények mutatják majd meg, hogy valóban azok voltak-e.

3/” egyben utalok rá, hogy az értekezés 110. oldalán az új tudományos eredmények felsorolásánál az 5. pontban elírás történt, mert nem SHMV, hanem BSMV VIGS vektorral végezték a kísérletet. Az elírás javítását kérem.”

Nagyon köszönöm opponensem javítását. Sajnos valóban elírás történt. Remélem lehetséges, hogy az MTA digitális depozitáriumába feltöltött változatban is javítsam az elírást.

4/” *S. lycopersicum és más gazdanövényeken PVX-, TMV- és TRV-VIGS vektorok hatását vizsgálták. Milyen kísérleti megközelítéssel lehetne a jelenség, a nem-cél gének expressziójának megváltozását eredményező folyamat megértéséhez közelebb kerülni?*”

A nem cél gének expressziójának változását legjobban nagy átírási képességű RNS szekvenálással lehet azonosítani. A legfontosabb az lenne, hogy az ilyen típusú kísérletekben a megfelelő kontrollok vizsgálata is megtörténjen, hiszen csak így lesz megállapítható, hogy az adott változás vajon a VIGS-el gátolt gén hiányának, vagy a VIGS-ként használt vírus fertőzésének a hatása-e.

5/” *A 93. oldalon a szöveg és a 96. ábra között ellentmondást érzek (11. minta), ill. feltételezem, hogy a szövegben a 12. számú mintánál elírás történthetett (valójában 15, 16?).*”

A 93. oldalon a 96. ábra eredményeit értelmező szövegbe valóban elírás történt. A 12_TC-ként jelzett minta valójában a 16-os minta volt, ahogy azt opponensem (a parányi, sajnos valóban nem jól olvasható ábrafeliratokból) helyesen következtette.

6/” *A fertőzöttség kimutatásánál alsó határként megadja, hogy egy 8-10 növény kivonatából kevert mintában legalább egy fertőzött növénynek kell lennie a kimutathatósági határ eléréséhez. Tudható-e, hogy ebben a növényben alacsony ill. magas multiplicitásban jelenlévő vírusok esetén van-e eltérés?*”

Tapasztalataink szerint valóban úgy találtuk, hogy 10 növény kivonatainak keverékében akkor tudtunk kimutatni egy vírust, ha egy fertőzött volt. De ez a határérték is változott vírusszerűen, mert pl a GRSPaV esetében az sRNS HTS nagyon sok esetben nem mutatta ki a jelenlévő vírust, ami szintén a rutin felhasználhatóság ellen szól.

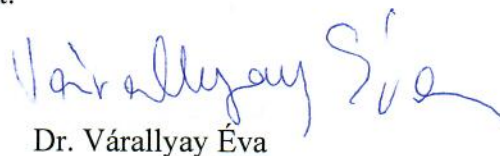
A vírusok eloszlása a növényekben nem egyenletes, ahogy az RNSi aktivitása sem. Fászszerűekben a hosszú vegetációs idő során is folyamatosan változik a víruskoncentráció. Ha aktív a védekezési folyamat kevés vírus genomikus RNS lesz a növényben, de ezzel párhuzamosan megnő az ugyanarról a vírusról keletkező sRNS-ek száma. Az RNS HTS-sel így esetleg a kimutathatóság alá csökken az adott vírus kimutathatósága, míg sRNS HTS-sel éppen ebben az esetben éri el a kimutatási limitet. A két módszer kombinációja pont ezért lehet eredményesebb, de a költségek miatt nagy számú minta tesztelésére nem lesz alkalmas. Az alacsony koncentrációban jelenlevő vírusok kimutatása problémás lehet, ez esetben a kimutathatóság növelhető az olvasatok számának növelésével, de ekkor az egy mintára eső szekvenálási költség nő meg.

7/" Megállapítja, hogy a fertőzések eredete valószínűleg a szaporítóanyagban keresendő. Lágyszárú növényeknél megfigyelték, hogy a szigorúan patogénmentes környezetben tartott növények szabadföldi körülmények közé kerülve viszonylag gyorsan vírusokat fognak be. Hogyan alakul ez fás szárúak ültetvényeiben, figyelembe véve azok hosszú élettartamát? Származhat-e a 6.4.2.10. fejezetben leírt GRVFFV izolátumok egy ültetvényen belül megfigyelt variabilitása utólagos fertőzésből?"

A szabadban, potenciális vektorokat tartalmazó közegben, fejlődő növények folyamatosan ki vannak téve a vírusfertőzés veszélyének. A vírusfertőzés az évtizedekig fenntartott gyümölcsfák, szőlő esetében sokszor a környező ültetvényekről, természetes környezetből ered, a vírust terjeszteni képes vektorok közvetítésével. Számos tanulmány vizsgálta egy-egy adott vírus ültetvényen belüli terjedésének dinamikáját, de ez a legtöbb esetben nem volt gyors és a fertőzött egyedek eltávolításával meg lehetett akadályozni a vírus teljes elterjedését. A fertőzött szaporítóanyag esetében alapvetően más a helyzet. Ha a fiatal ültetvény nagy része fertőzött, a növények a növekedésük kezdeti szakaszában is hátrányt szenvedhetnek, nehezebb az eredés, sérülékenyebb, betegségekre fogékonyabb lehet az oltvány. Az esetlegesen megjelenő vektorok viszonylag hamar elterjeszthetik az ültetvény teljes egészén a vírust, így a terjedés kontrolálhatatlanná válik. Így tehát a vírusmentes, egészséges szaporítóanyag használata valóban alapvetően fontos és a jól eredő, hamar termőre forduló ültetvény záloga. A GRVFFV egy igen elterjedt és nagyon variábilis vírus. Az, hogy egy ültetvényen belül különböző variánsokat találtunk valóban felveti annak a lehetőségét, hogy a fertőzés több, egymástól független időpontban történt. Egy másik, talán valószínűbb alternatíva azonban éppen az, hogy a variábilis vírus több variánsa is jelen volt az ültetvény telepítésénél, és ezek az egy ültetvényben, vagy akár egy növényben levő variánsok a telepítés óta eltelt hosszú idő alatt tovább mutálódnak, illetve rekombinálódtak, és így több új variáns éppen az ültetvényen keletkezett. Ez egy rendkívül érdekes, és a tymovírusok esetében, gyakorinak tűnő folyamat. A GRVFFV klónok elemzése során találtunk olyan variánst is, ami a közeli rokon a GSyV1 egy darabját tartalmazta, ami nemcsak a vírusevolúció, hanem a diagnosztika szempontjából is fontos kérdés és mindenképpen érdemes lenne a jövőben tovább vizsgálni.

Végül szeretném újra megköszönni Lukács Noéminek, hogy elvállalta és elkészítette dolgozatom bírálatát. Remélem a válaszaira adott kérdéseimet elfogadja és továbbra is támogatja számomra az MTA doktori címének odaítélését.

Gödöllő, 2021. július. 21.



Dr. Várallyay Éva